

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-018472

(43)Date of publication of application : 25.01.1994

(51)Int.Cl.

G01N 27/327  
G01N 27/28  
// C12Q 1/00

(21)Application number : 04-172376

(71)Applicant : NEW OJI PAPER CO LTD

(22)Date of filing : 30.06.1992

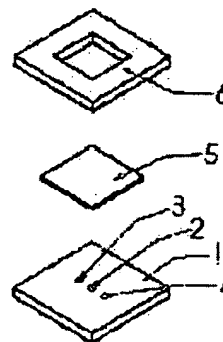
(72)Inventor : KARIGOME AKIO  
HAYASHI RYUZO  
HASHIZUME YOSHIO

## (54) ELECTRODE FOR ELECTROCHEMICAL MEASUREMENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide an electrochemical measurement electrode using immobilized enzyme, while ensuring a simple constitution and the capability of measurement suppressing adverse effect of a measurement hindering substance.

CONSTITUTION: An electrochemical measurement electrode has an electrode system comprising at least a working electrode 2 and a counter electrode 3, and a water absorber 5 of immobilized enzyme. Also, the water absorber 5 is a negative ion exchanger having a basic functional group. The negative ion exchanger in this case, may be, for example, diethylaminoethyl cellulose, epichlorohydrine triethanolamine cellulose or triethylammonium ethylcellulose.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-18472

(43)公開日 平成6年(1994)1月25日

(51)IntCl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

G 0 1 N 27/327

27/28

3 3 1 Z 7235-2J

// C 1 2 Q 1/00

B 6807-4B

7235-2J

7235-2J

G 0 1 N 27/ 30

3 5 3 J

3 5 3 Z

審査請求 未請求 請求項の数2(全 6 頁)

(21)出願番号

特願平4-172376

(22)出願日

平成4年(1992)6月30日

(71)出願人 000192682

神崎製紙株式会社

東京都中央区銀座4丁目9番8号

(72)発明者 刈米 昭夫

兵庫県尼崎市常光寺4丁目3番1号 神崎  
製紙株式会社神崎工場内

(72)発明者 林 隆造

兵庫県尼崎市常光寺4丁目3番1号 神崎  
製紙株式会社神崎工場内

(72)発明者 橋爪 義雄

兵庫県尼崎市常光寺4丁目3番1号 神崎  
製紙株式会社神崎工場内

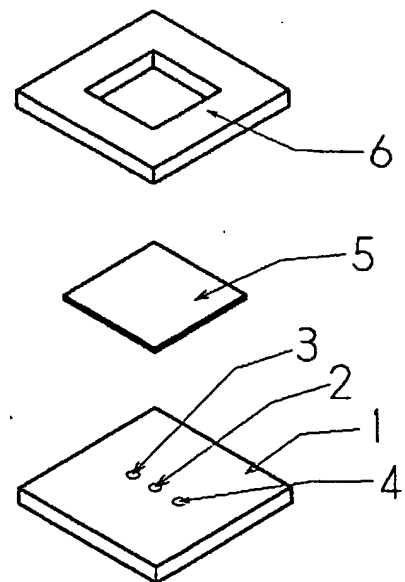
(74)代理人 弁理士 蓮見 勝

(54)【発明の名称】 電気化学測定用電極

(57)【要約】

【目的】 簡便な構成で測定妨害物質の影響を抑えた測定が可能な固定化酵素体を用いた電気化学測定用電極を提供することを目的とする。

【構成】 少なくとも作用電極2と対極3を有する電極系と、酵素を固定化した吸水体5とを有する電気化学測定用電極であり、前記吸水体が塩基性官能基を有する陰イオン交換体である電気化学測定用電極。陰イオン交換体としてはジエチルアミノエチルセルロース、エピクロルヒドリントリエタノールアミンセルロース、トリエチルアンモニウムエチルセルロース等が例示できる。



(2)

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくとも作用電極と対極を有する電極系と、酵素を固定化した吸水体とを有する電気化学測定用電極であり、前記吸水体が塩基性官能基を有する陰イオン交換体である電気化学測定用電極。

【請求項2】 陰イオン交換体がジエチルアミノエチルセルロース、エピクロロヒドリントリエタノールアミンセルロース、トリエチルアンモニウムエチルセルロースより選ばれる少なくとも1種を含む請求項1記載の電気化学測定用電極。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、電気化学測定用の2電極または3電極系を少なくとも一組備えた測定用電極に関し、特に簡便な構成で測定妨害物質の影響を抑えた測定が可能な固定化酵素体を用いた電気化学測定用電極に関するものである。

【0002】

【従来の技術】近年分析の多様化にともなって、新しい分析方法の実用化が多々検討されている。その中でも電気化学測定はポーログラフィー等従来よりの測定法に加え、液体クロマトグラフィーやフローインジェクション分析などと組み合わせられ広い範囲で応用されている。

【0003】電気化学検出の特長は、

(1) 一般には測定困難な化学量を、測定が容易な電流量に直接変換して測定するために簡単に行える。

(2) ファラデーの法則に従って進行する電気化学反応を観察するために、電流値や電流量から微量な物質変化を捉えることができ高感度の測定が行える。

(3) 反応の過程を即時に知ることができ、迅速な検出・定量が可能である。

などであり、ポテンシオメトリー、アンペロメトリー、ポーログラフィー、クーロメトリー、インピーダンス測定、サイクリックボルタンメトリー等の方法で各種物質の測定に応用されている。

【0004】従来電気化学測定ではサイクリックボルタンメトリーやパルスボルタンメトリーなどは選択性を向上させる測定方法として用いられてきたが、被測定物質と妨害物質との選択透過の比率や測定時間の短縮化などの点において十分な成果が得られているとは言い難かった。一方、各種化学物質に対する選択的な反応性に優れている酵素・微生物・抗原・抗体やそれらの固定化素子など、近年の技術進歩によって実用化がすすんでいる生物由来の変換素子と組み合わせてバイオセンサーを構築し、その応用範囲も広がっている。

【0005】これらの生物由来の変換素子の中で、基質と反応して酵素を消費したり過酸化水素を生成する酸化酵素は、応答速度、感度共に優れており生成物の電気化学的検出が容易なために特に頻繁に用いられている。一方、電気化学測定には一つの問題点として電極等の電気

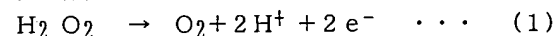
2

化学検出器部分での選択性の低さが挙げられる。これは検出の最終段が電流値のみに依存しているために、被測定物質の反応によって生じた電流か、妨害物質によって生じた電流かの区別が困難なことが原因となっている。

【0006】被測定物質と妨害物質が試料中に共存しているような場合、アンペロメトリー法で酸素濃度を検出する酸素電極では、気体の透過のみを許し他の物質は透過しない気体透過膜を電極表面に装着し成果を挙げている。しかし一般に酸素電極に用いられている気体透過膜は、フッ素樹脂等の材質で構成されている場合には固定化酵素膜を直接その表面上に製膜するのは困難である。

【0007】また酸素電極法は応答速度の点で過酸化水素検出方式に劣るものであり、高速で電気化学測定を行うおうとする場合、過酸化水素検出型が望ましい。しかし、過酸化水素電極では妨害物質の問題がある。測定試料中にアスコルビン酸等の測定妨害物質が混入していると、正しい測定が出来なくなる。測定用電極は重要であり、このような測定妨害物質による影響は測定装置全体の基本性能を左右する問題である。

【0008】過酸化水素をアンペロメトリー法で検出する場合、過酸化水素の次式(1)であらわされる電極表面での分解反応の酸化還元電位は0.68V(対標準水素電極、25℃)であるので、検出電極には通常用いられる銀・塩化銀参照電極に対して約0.46V以上の電位に保持する必要がある。



しかし、測定妨害物質の代表的な物質であるアスコルビン酸を例にとれば、アスコルビン酸の標準酸化還元電位は0.34V(pH7.0)であるので過酸化水素の酸化電流を検出しようとするればアスコルビン酸の酸化電流値も上乘せられてしまう。

【0009】そこで過酸化水素電極と固定化酵素体を組み合わせたバイオセンサーでは、酵素反応により生じた過酸化水素に対し、妨害物質の応答を低く抑える必要がある。従来よりアセチルセルロース膜など種々の過酸化水素選択透過膜を測定用セルに装着あるいは電極表面を被覆するようにあらかじめ製膜した測定セルを固定化酵素体と組み合わせた測定用電極が考案されている。

【0010】例えば、特開昭60-56254号にはアセチルセルロースを素材にした過酸化水素選択透過膜を装着した電極が例示されている。しかし、アセチルセルロースは水に不溶であるために、揮発性有機溶媒に溶解後展開し製膜しなければならない。この製造方法では有機溶媒が蒸発しやすいために、アセチルセルロース濃度が増減しやすく、一定の厚みの膜を作成して選択透過能に再現性のある膜を得ることは技術的な困難をともなう。

【0011】また特開昭60-173452号には多孔性膜中または表面にタンパク質ゲルを形成させ架橋試薬を用いて製膜した選択透過膜が開示されている。しか

(3)

3

し、過酸化水素に対する選択性を向上させようとタンパク質ゲルを緻密なものにすれば、過酸化水素自身の透過速度も影響を受け迅速な測定が困難となってしまう。

【0012】このように従来用いられてきた測定セルおよび電極と固定化酵素体を組み合わせた構成では、酵素反応によって生成した過酸化水素に対する選択性が不十分であったり、応答速度が不十分であるといった問題があった。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】上記の様に従来技術においては選択透過膜の膜内の透過速度の差によって選択性を確保するために選択性が不十分であったり、過酸化水素に対する応答速度の低下が避けられなかった。本発明は、電気化学測定用の2電極または3電極系を少なくとも一組備えた過酸化水素測定用電極に関し、特に簡便な構成で測定妨害物質の影響を抑えた測定が可能な固定化酵素体を用いた電気化学測定用電極を提供することを目的とする。

【0014】

【課題を解決するための手段】本発明は、少なくとも作用電極と対極を有する電極系と、酵素を固定化した吸水体を有する電気化学測定用電極であり、前記吸水体が塩基性官能基を有する陰イオン交換体である電気化学測定用電極である。ただし本発明では、酵素を固定化する吸水体と、測定妨害物質を補足するための吸水体の機能を別の吸水体層で構成して2層の吸水体構成としても同じことであり、ここでの「吸水体」を2層として、測定妨害物質補足用の吸水体のみを塩基性官能基を有する陰イオン交換体としてもよい。

【0015】本発明は、陰イオン交換体がジエチルアミノエチルセルロース、エピクロルヒドリントリエタノールアミンセルロース、トリエチルアンモニウムエチルセルロースより選ばれる少なくとも1種を含む上記の電気化学測定用電極を開示する。試料中の測定物は、酵素の反応により電極活性物質を生成し、電極系により測定される。この際試料は吸水体を透過せずに直に電極と接触しないように構成されている。例えば、電極系は酵素を固定化した吸水体で覆われている。

【0016】酵素を固定化した吸水体とは、吸水体に酵素液を含ませて乾燥してもよいが、酵素を多価アルデヒド類等を用いて固定化することが好ましく、この際酵素とともに他のタンパク質を混ぜて固定化してもよい。本発明は、少なくとも1個の窒素をその原子団中に含み蒸留水中でのpKa値が6以上の官能基で修飾された水が含ま浸または透過する吸水体に、1種類以上の酵素と必要ならば他のタンパク質とともに固定化した酵素固定化体を、少なくとも作用電極表面を被覆するように装着したことを特徴とする電気化学測定用電極を開示する。

【0017】また本発明は、少なくとも1個の窒素をその原子団中に含み蒸留水中でのpKa値が6以上の官能

4

基が、1～3級アミンまたはその誘導体であることを特徴とする上記の電気化学測定用電極を開示する。

【0018】

【作用】一般に電気化学測定において酵素等の生物由来の変換素子によって生成する過酸化水素を検出するためには、電極構成が簡単であり高感度測定に優れているため、白金等の電極を用いたアンペロメトリーが多く用いられている。しかしこの場合、被測定試料中に酵素反応により生成する過酸化水素と同電位で電解電流を生じる還元物質が共存すると測定値に誤差を与える。このような測定妨害物質にはアスコルビン酸、還元型グルタチオン、尿酸など、ごく一般的に食品・発酵液等の試料中に存在する物質も多く含まれる。したがって固定化酵素体と電気化学測定を用いて精度の良い測定を行うためには、これら測定妨害物質に対する何等かの対策が必要となる。本発明者等は、試料中に含まれる測定妨害物質の多くは塩基性官能基を有する陰イオン交換体により補足されることを見出し、測定妨害物質の影響を除き、正確な測定を可能とする本発明を完成したものである。

【0019】塩基性官能基を有する陰イオン交換体としては、少なくとも1個の窒素をその原子団中に含み蒸留水中でのpKa値が6以上の官能基が結合した、水が含ま浸または透過する吸水体が好ましい。官能基のpKaが低すぎると十分な測定妨害物質の捕捉効果をめしえず、選択性向上の効果は認められないので、本発明で用いる吸水体に結合した官能基のpKaは6以上であることが望ましい。

【0020】この時に用いる吸水体は、水が含ま浸または透過するものであればその種類を問わず、例えば分析用ろ紙などの紙類、ガーゼ等の布類あるいは不織布類、ナイロン等の化学繊維で織られたメッシュ類、水に不溶性の素材で作られたフィルター類等を用いることができる。吸水体に官能基を導入する工程は、酵素を多価アルデヒド類を用いて固定化する以前に行っておくことが必要である。

【0021】具体的には、測定用電極を構成する場合に用いることができる固定化酵素体の基体となる吸水体としては、ジエチルアミノエチル基-CH<sub>2</sub>・CH<sub>2</sub>N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>をセルロースの水酸基にエーテル結合させたジエチルアミノエチルセルロース(DEAEろ紙、ジエチルアミノエチル基のpKaは9.5程度)、トリエチルアンモニウムエチル基-CH<sub>2</sub>・CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>をセルロースの水酸基にエーテル結合させたトリエチルアンモニウムエチルセルロース(TEAEろ紙)、セルロースにエピクロルヒドリンとトリエタノールアミンとをアルカリ性で反応させて得られるエピクロルヒドリントリエタノールアミンセルロース(ECTEOLAろ紙、pKaは6～8)等の弱塩基性官能基を持った陰イオン交換ろ紙などが好ましく用いられる。弱塩基性官能基とは上記のpKaが6以上の官能基が該当す

(4)

5

る。特に限定しないが、上記の陰イオン交換紙は、例えば0.1～0.36meq/g程度の交換容量を持っている。

【0022】吸水体には、1種類以上の酵素と必要ならば他のタンパク質とともに、例えば多価アルデヒド類等により固定化した酵素固定化体を、少なくとも作用電極表面を被覆するように装着して電気化学測定用電極を構成する。本発明では、例えば酵素を固定化する吸水体と、測定妨害物質を補足するための吸水体の機能を別の層構成としてもよい。即ち電極系の上に測定妨害物質を補足するための吸水体層を設け、更にその上に酵素を固定化した吸水体を設けてもよい。

【0023】酵素は吸水体に単に含浸させて固定化してもよいが、吸水体表面に別の官能基を導入し、この官能基と酵素を結合させる共有結合法、またグルタルアルデヒド等の多官能性アルデヒドを用いる方法等の架橋法、例えばアガロースゲル等を用いる包括法等の方法がある。酵素の固定化に用いる架橋剤としてはグルタルアルデヒド、スクシンジアルデヒド、グリオキサール等の多価アルデヒド類、カルボジイミド試薬、イソシアナート類、ジアゾニウム化合物等が例示できる。

【0024】本発明で使用する酵素は、グルコースオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ等のオキシダーゼや乳酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ等の脱水素酵素、或いはオキシゲナーゼ等が例示できる。酵素とともに固定化できるタンパク質としてはコラーゲン、エラスチン、フィブリン等の構造タンパク質、およびその部分分解物であるゼラチン等のタンパク質、アルブミン、グロブリン等の血清タンパク質、カゼイン、オボアルブミン等のタンパク質、および各種の酵素分子やその変性物等を例示できる。これにより酵素活性の安定化等の効果が得られる。

【0025】電気化学測定用電極を組み込むセルの素材はアクリル、フッ素樹脂、塩化ビニル樹脂、ガラス等の非導電性素材、またステンレス、金、白金等の導電性素材或いはこれらを組み合わせたものを用いることができる。導電性素材を使用する場合は、電極系との電氣的絶縁処理を行っておく等の注意を要する。電極としては、作用電極・対極より構成される2電極系、または作用電極・参照電極・対極より構成される3電極系を例示することができる。電極は例えば測定セル底面中に導電性物質を埋め込んだり、内壁表面に金属を蒸着する方法、溶液メッキ法、無電解メッキ法、印刷等の方法で形成することができる。対極と参照電極は、溶液間抵抗の影響を小さく抑えるために作用電極の近傍に設けることが望ましい。

【0026】本発明による電気化学測定用電極の構成は、ごく一般的に用いられる白金等を基材とした過酸化水素電極と組み合わせて用いることができる。作用電極には、金、白金、銀などの金属電極あるいはグラッシーカ

6

ーボン、カーボンペーストなどの通常電気化学計測で用いられる素材が利用できる。対極には作用電極ですでに例示した材質やステンレス等の導電性素材を用いることができ、ステンレスなどの導電性素材を用いて構成したセルの接液部を対極とすることもできる。

【0027】参照電極には銀・塩化銀参照電極、飽和カロメル参照電極など一般的のものを例示できる。本発明で開示された電気化学測定用電極を適当な検出装置、検出回路に接続することにより、過酸化水素測定装置を構成し、前記の酵素や、微生物、抗原、抗体やそれらの固定化素子と組み合わせることにより、バイオセンサーを構成することができる。

【0028】

【実施例】以下に実施例を挙げて、本発明の内容をさらに詳細に説明するが、もちろん本発明はこれらに限定されるものではない。

【0029】実施例1

市販ポテンシオスタット装置(HECS1100型:扶桑製作所製)に接続した白金作用電極、銀・塩化銀参照電極、対極の3電極系を用いて本発明の電気化学測定用電極を構成し測定を行った。

(1) 電気化学計測用測定セルの作成方法

図1にセルの構成図を示す。30mm×30mm、厚み3mmのアクリル板のセル底面(1)に直径2mmの白金線2本を作用電極(2)・対極(3)とした。同じく直径2mmの銀線1本を端面がアクリル板面と同一になるように直線に配置し埋め込んでエポキシ樹脂でシールした。銀線の端面は0.1M塩酸水溶液中、対飽和カロメル参照電極0.250Vの電位で30分電解し、塩化銀を析出させ銀・塩化銀参照電極(4)とした。

(2) 酵素固定化膜の作成方法

少なくとも1個の窒素をその原子団中に含み蒸留水中でのpKa値が6以上の官能基で修飾された水が含浸または透過する吸水体水として、ジエチルアミノエチル基が導入された市販化学分析用紙(DEAEろ紙、アドバンテック東洋社製)を用いた。ろ紙を20mm×20mmに裁断し、0.2重量%のグルタルアルデヒドを含んだ0.5重量%のグルコースオキシダーゼ(Type I:シグマ社製)と0.5重量%のウシ血清アルブミン(Fraction V:シグマ社製)の水溶液を100μl展開し、風乾して固定化酵素膜を形成した。

【0030】(3) 測定方法

測定用セルの電極面が覆われるように固定化酵素膜

(5)を装着し、その上から15mm×15mmの開口部を持ったアクリル製の押え板(6)を装着しネジ止めし電気化学測定用電極を構成した。対銀・塩化銀参照電極0.6Vの電位を白金作用電極に印加しておき、50mM塩化カリウムを含む100mMリン酸緩衝液に溶解した0.5mMグルコース溶液中に浸漬し得られる電解電流値を、浸漬直後から180秒間レコーダーにて記録

(5)

7

した。同様に、50 mM塩化カリウムを含む100 mMリン酸緩衝液に溶解した0.5 mM過酸化水素溶液中に浸漬し得られる電解電流値を、浸漬直後から180秒間レコーダーにて記録した。同様に、50 mM塩化カリウムを含む100 mMリン酸緩衝液に溶解した0.5 mMアスコルビン酸水溶液中に浸漬し得られる電解電流値を、浸漬直後から180秒間レコーダーにて記録した。同様に、50 mM塩化カリウムを含む100 mMリン酸緩衝液に溶解した0.5 mM尿酸水溶液中に浸漬し得られる電解電流値を、浸漬直後から180秒間レコーダーにて記録した。

#### 【0031】(4) 結果

得られた電解電流値の変化の様子を電流値増加速度になおすと図2のようになった。図2で1は、過酸化水素溶液の電解電流値増加速度曲線を、2はグルコース溶液の電解電流値増加速度曲線を、3はアスコルビン酸溶液の電解電流値増加速度曲線を、4は尿酸溶液の電解電流値増加速度曲線を示す。グルコースに対する電解電流は浸漬後15秒後より観測でき、80秒後に0.578 nA/秒の最高速度に達した。過酸化水素に対する電解電流は浸漬後10秒後より観測でき、50秒後に2.14 nA/秒の最高速度に達した。アスコルビン酸と尿酸に関しては、浸漬直後から180秒後までのあいだでは、電流値の増加は認められなかった。

【0032】したがって最高速度で比較した出力値の選択比は、グルコース100%に対して、過酸化水素370%、アスコルビン酸0%、尿酸0%であった。

#### 【0033】比較例1

##### (1) 電気化学計測用測定セルの作成方法

実施例1と同様のセルを作成して用いた。

##### (2) 測定方法

実施例1と同様の測定を行った。ただしグルコースオキシダーゼの固定化酵素膜は、ろ紙を全く用いず、直接、白金作用電極、銀・塩化銀参照電極、対極を被うように実施例1と同様の酵素溶液を100  $\mu$ l展開し、風乾して製膜し電気化学測定用電極を構成して測定を行った。

#### 【0034】(3) 結果

得られた電解電流値の変化の様子を電流値増加速度になおすと図3のようになった。図3で1は、過酸化水素溶液の電解電流値増加速度曲線を、2はグルコース溶液の

8

電解電流値増加速度曲線を、3はアスコルビン酸溶液の電解電流値増加速度曲線を、4は尿酸溶液の電解電流値増加速度曲線を示す。グルコースに対する電解電流は浸漬後5秒後より観測でき、30秒後に1.56 nA/秒の最高速度に達した。過酸化水素に対する電解電流は浸漬後2秒後より観測でき、15秒後に5.67 nA/秒の最高速度に達した。アスコルビン酸に対する電解電流は浸漬後7秒後より観測でき、40秒後に3.79 nA/秒の最高速度に達した。尿酸に対する電解電流は浸漬後15秒後より観測でき、60秒後に3.54 nA/秒の最高速度に達した。

【0035】したがって最高速度で比較した出力値の選択比は、グルコース100%に対して、過酸化水素363%、アスコルビン酸243%、尿酸227%であった。比較例1に比べて、実施例1が出力値の選択比よくグルコースを測定できることは明らかである。

#### 【0036】

【発明の効果】本発明により、簡便で測定妨害物質の影響を抑えた測定が可能な、固定化酵素体を用いた電気化学測定用電極を構成することが可能となった。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は実施例1において用いた電気化学測定用セルの構成図の1例である。

【図2】図2は実施例1において得られたグルコース、過酸化水素溶液、アスコルビン酸、尿酸溶液の電解電流値増加速度曲線である。縦軸は電解電流値の増加速度(nA/秒)、横軸は電極を浸漬してからの経過時間(秒)を示している。

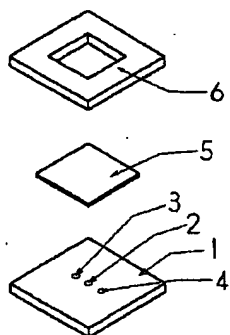
【図3】図3は比較例1において得られたグルコース、過酸化水素溶液、アスコルビン酸、尿酸溶液の電解電流値増加速度曲線である。縦軸は電解電流値の増加速度(nA/秒)、横軸は電極を浸漬してからの経過時間(秒)を示している。

#### 【符号の説明】

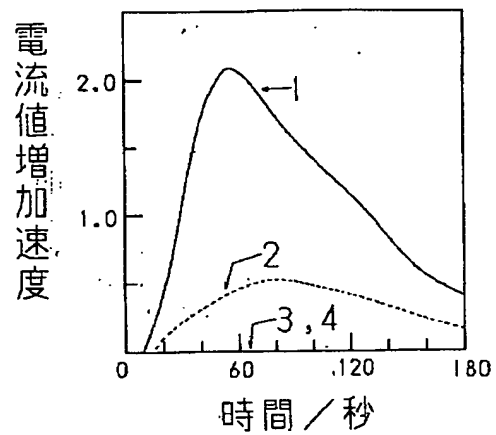
- |   |           |
|---|-----------|
| 1 | セル底面      |
| 2 | 作用電極      |
| 3 | 対極        |
| 4 | 銀・塩化銀参照電極 |
| 5 | 固定化酵素膜    |
| 6 | 押え板       |

(6)

【図1】



【図2】



【図3】

